

(12)特許協力条約に基づいて公開された出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/100095 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, 33/533, 33/566
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/05773
- (22) 国際出願日: 2003 年 5 月 8 日 (08.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-132995 2002 年 5 月 8 日 (08.05.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市南区 東九条西明田町 5 7 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 猪瀬 健 (INOSE, Ken) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市南区 東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒103-0004 東京都 中央区 東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING TARGET NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 標的核酸の検出法

(57) Abstract: A target nucleic acid in a sample having a target sequence is detected by the following steps: (a) mixing the sample with a first probe, which comprises a nucleic acid having a specific region having a sequence complementary to the target sequence as described above and a non-specific region having a sequence not complementary to the target sequence, and a second probe, which comprises a nucleic acid having a first region complementary at least to a part of the non-specific region of the first probe, a loop region having no sequence complementary to the first probe and a second sequence complementary to at least a part of the specific region of the first probe, the loop region of which can form a loop when annealed with the first probe and which is labeled with a labeling enabling the detection of the loop formed above, under such conditions as allowing the annealing of the first probe with the second probe and the first probe with the target sequence; and (b) detecting the loop formed by the first probe and the second probe.

[続葉有]



---

(57) 要約:

下記ステップにより、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する。

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープと、試料とを、第1のプロープと第2のプロープ、及び第1のプロープと標的配列とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 第1のプロープと第2のプロープにより形成されるループを検出する。

## 明細書

## 標的核酸の検出法

## 技術分野

本発明は、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法及びキットに関する。本発明の方法及びキットは、標的核酸をリアルタイムに検出することができ、生化学等の分野で有用である。

## 背景技術

試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法として、プローブを用いたハイブリダイゼーション法、及び、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR法等が用いられている。また、PCR法は、標的核酸の検出やクローニング等、様々な分野で汎用されており、種々の改良法が開発されている。

PCR法において、標的配列の増幅と増幅産物の分析を同時に行う、いわゆるリアルタイムPCRが知られている。増幅産物を分析する手段としては、例えば、Taq-Manプローブ法（米国特許第5,210,015号、特表平6-500021号、Holland et al., Pro. Natl. Aca. Sci. USA., 88, 7276-7280, 1991）、モレキュラービーコン法（特開平5-123195号、Sanjay Tyagi et al., Nature Biotechnology, vol 14, March 1996）、及びインターカレーター法（Bio/Technology, 10, 413-417, 1992、Bio/Technology, 11, 1026-1030, 1993、特開平5-237000号）等が知られている。

Taq-Manプローブ法では、蛍光物質と、この蛍光物質が発する蛍光を消光するクエンチャーで標識されたプローブが用いられる。このプローブは、標的核酸にハイブリダイズしているときは、蛍光はクエンチャーにより消光されるが、PCRに用いられるポリメラーゼの5'→3'エキソヌクラーゼ活性により増幅反応時に切断される。その結果、クエンチャーから蛍光物質が遊離して、蛍光を発する。この蛍光によって、二本鎖DNA分子の量を知ることができる。

また、モレキュラービーコン法は、標的配列に相補的な配列と、その両側に互いに相補的な配列を有するアームからなり、両端に蛍光物質とクエンチャーが結

合したプローブを用いる方法である。このプローブは、標的核酸にアニールしているときは、蛍光物質は蛍光を発するが、標的核酸から解離すると、アームを形成することにより蛍光物質とクエンチャーが接近して消光される。

一方、インターカレーター法は、エチジウムブロマイド等のインターカレーターを用いて、二本鎖DNAを検出する方法である。

上記のように、リアルタイムにPCR増幅産物を定量する方法が知られているが、Taq-Manプローブ法は、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持たないポリメラーゼを用いる増幅法の場合は適用することができず、モレキュラービーコン法は、プローブの設計が困難であり、また、分子内結合の為検出効率が悪く、インターカレーター法は、配列の特異性がないという問題がある。

#### 発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持つポリメラーゼを使用しなくても、標的核酸をリアルタイムに、かつ、簡便に定量する方法及びキットを提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、長短二種類のプローブを用いることにより、標的核酸を簡便に定量することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法であって、下記ステップを含む方法：

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプローブと、第1のプローブの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプローブに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプローブの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の領域とを有し、第1のプローブとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプローブと、試料とを、第1のプローブと第2のプローブ、及び第1のプローブ

と標的核酸とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 前記標識物質の信号を検出する。

(2) 第2のプロープの第2の領域は、第1のプロープの特異的領域よりも短いことを特徴とする(1)の方法。

(3) 前記標識物質が、各々ループ領域を挟んで配置された蛍光物質と、この蛍光物質の近傍にあると蛍光物質の蛍光を消光するクエンチャーであり、第1のプロープと第2のプロープがアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、第1のプロープが第2のプロープとアニールしていないときは前記蛍光はアニールしているときと比べて消光されないことを特徴とする(1)又は(2)の方法。

(4) 前記信号の検出を定量的に行い、それによって標的核酸を定量することを特徴とする(1)～(3)のいずれかの方法。

(5) 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出するためのキットであって、前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープとを含むキット。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の概念を示す概略図である。Fは蛍光物質を、Qはクエンチャーを表す。

図2は、反応液の蛍光強度の経時的変化を示すグラフ図（加熱処理しないもの）である。

実線：プロープ1 + プロープ2 + 標的オリゴヌクレオチド

点線：プロープ1 + プロープ2

一点鎖線：プローブ 2

図 3 は、反応液の蛍光強度の経時的変化を示すグラフ図（加熱処理したもの）である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法は、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法である。標的核酸は、標的配列を有するものであれば特に制限されず、DNAであってもRNAでもよく、また、一本鎖でも二本鎖でもよい。本発明は、特に二本鎖DNAの検出に好適に適用される。本発明の好ましい形態においては、標的核酸は定量的に検出される。尚、定量的な検出とは、核酸の絶対量を測定すること、及び、核酸の量のある量に対して相対的に測定することを含む。

標的配列は、通常、標的核酸に特異的な配列であり、この配列に相補的な配列を有するプローブと特異的なハイブリッドを形成し得るものであれば、配列及び長さは特に制限されない。標的配列の長さは、好ましくは 6 塩基以上、より好ましくは 15 塩基以上である。

標的核酸を含む試料としては、特に制限されないが、細胞、組織から抽出した核酸又は核酸混合物、又はこのような核酸又は核酸混合物を鋳型とする PCR 核酸増幅反応液が挙げられる。

本発明では、標的核酸の検出に 2 種類のプローブが用いられる（図 1 参照）。第 1 のプローブ（以下、「プローブ 1」ともいう）は、標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる（図 1 A）。このような構造から、プローブ 1 は、標的核酸にハイブリダイズしたときに、非特異的領域は、一本鎖のままフラップを形成する（図 1 B）。非特異的領域の長さは、好ましくは 10 塩基以上、より好ましくは 10～30 塩基である。

第 2 のプローブ（以下、「プローブ 2」ともいう）は、前記プローブ 1 の非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第 1 の領域と、プローブ 1 に相補的な配列

を有さないループ領域と、プローブ 1 の特異的領域の少なくとも一部に相補的な第 2 の領域とを有し、プローブ 1 とアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる（図 1 A）。

尚、図 1 には、5' 側に特異的領域を、3' 側に非特異的領域を有するプローブ 1 と、第 1 の領域、ループ領域及び第 2 の領域を 5' 側から順に有するプローブ 2 の例が示されている。本発明においては、プローブ 1 は 3' 側に特異的領域を、5' 側に非特異的領域を有し、プローブ 2 は第 1 の領域、ループ領域及び第 2 の領域を 3' 側から順に有していてもよい。

第 1 の領域は、プローブ 1 の非特異的領域の少なくとも一部に相補的な配列を有し、好ましくは、非特異的領域の全体に相補的な配列を有する。一方、第 2 の領域は、プローブ 1 の特異的領域の少なくとも一部に相補的な配列を有し、好ましくは特異的領域よりも短い。第 2 の領域を特異的領域よりも短くすることによって、プローブ 1 は、プローブ 2 よりも、標的核酸に優先的にアニールすることができる。第 2 の領域の長さは、好ましくは 6 塩基以上、より好ましくは 6 ~ 20 塩基である。あるいは、第 2 の領域は、特異的領域よりも、好ましくは 1 塩基以上、より好ましくは 4 塩基以上短くすることが望ましい。

ループ領域は、プローブ 1 と相補的な配列を有さない領域であり、好ましくは標的核酸とも相補的な配列を有さない。ループ領域は、プローブ 2 がプローブ 1 に結合しているときはループ状の突出部を形成するが、プローブ 2 とプローブ 1 が解離すると、ループ構造は解消される（図 1 C）。プローブ 2 は、ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識される。標識物質は、具体的には例えば、各々ループ領域を挟んで配置されるエネルギー供与体とエネルギー受容体からなる。エネルギー供与体及びエネルギー受容体は、例えば、蛍光物質と、この蛍光物質が発する蛍光を消光するクエンチャーが挙げられる。クエンチャーは、蛍光物質の近傍にあると蛍光を消光するが、蛍光物質との距離が一定以上になると消光しなくなる。このような蛍光物質及びクエンチャーを用いると、プローブ 1 とプローブ 2 がアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、プローブ 1 がプローブ 2 とアニールしていないと

きは蛍光は消光されない。したがって、蛍光物質からの蛍光を測定することにより、ループの形成、すなわちプローブ1とプローブ2とのハイブリダイゼーションの状態を検出することができる。蛍光物質としては、例えばフルオロセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 等のフルオレセイン系の色素等を、クエンチャーとしては例えばテトラメチルローダミンイソチオシアネイト (TRITC)、スルフォローダミン101の塩化スルホン酸誘導体(商品名：テキサスレッド)等のローダミン系の色素等が挙げられる。これらのうち、好ましい組合せは、FITCとテキサスレッドである。これらの標識物質は、これらの標識物質が結合したオリゴヌクレオチドを用いてプローブ2の化学合成を行うことにより、配列中の任意の部位に導入することができる。蛍光物質及びクエンチャーは、どちらが5'側にあってもよい。

ループ領域の配列及び長さは、プローブ1とプローブ2がアニールしたときにループ構造が形成され、ループ構造が形成されたときと解消されたときとで標識物質からの信号が異なるものであれば特に制限されない。尚、ループ領域は、ループ領域がプローブ2の第1の領域及び第2の領域と部分二本鎖を形成せず、かつ、ループ領域内で部分二本鎖を形成しないように設計することが好ましい。ループ領域の長さは、好ましくは10塩基以上、より好ましくは20塩基以上である。標識物質は、通常、ループ領域の両末端塩基から3塩基内、好ましくは両末端塩基に結合していることが望ましい。

上記のようなプローブ1、プローブ2及び試料とを、プローブ1とプローブ2、及びプローブ1と標的核酸とがアニールする条件で混合する。但し、前記のような各プローブの構造から、プローブ1は、プローブ2よりも、標的核酸と優先的にアニールする。混合の順序は特に問わず、例えば、プローブ1とプローブ2を混合した後、試料を加える。また、プローブ1とプローブ2を予め混合したものを用意しておいてもよい。また、プローブ1及び又は試料を含まない反応液をコントロールとして用いることが好ましい。

プローブ1とプローブ2は、好ましくは1:1のモル比で混合される。プローブ1とプローブ2の最終的な反応液中の濃度は、各々好ましくは0.1  $\mu$ M以上である。



プローブ 1、プローブ 2 及び試料を混合した後は、そのままプローブ 1 とプローブ 2、及びプローブ 1 と標的核酸とがアニールする条件に置いてよいし、一旦熱変性処理を行った後、前記条件に置いてよい。

上記反応液を、一定時間経過後、好ましくは平衡状態状態に達した後に、標識物質の信号を検出する。より好ましくは、信号の検出は経時的に行う。前記条件は、例えば、プローブ 1 とプローブ 2 の  $T_m$  より 3 ~ 10 °C 低い温度が挙げられる。最適な条件は、何段階か温度を変えて、信号の検出を経時的に行い、コントロールとの差異が最も明確になる条件を選択することにより、容易に決定することができる。蛍光物質として FITC を、クエンチャーとしてテキサスレッドを用いた場合、信号の検出は、FITC に由来する蛍光波長 515nm の蛍光強度を測定することにより行われる。蛍光強度の測定は、市販の装置を用いて測定することができる。測定結果を図 2 及び図 3 に例示する。これらの結果については、実施例において詳述する。

標識物質の信号の検出を定量的に行うことによって、標的核酸の量を定量することができる。

本発明のキットは、上記標的核酸を検出するために用いられるものであり、プローブ 1 及びプローブ 2 を含むキットである。各プローブは、溶液であっても、凍結乾燥品であってもよい。また、各プローブは、各々別の容器に入れられていてもよいし、同一の容器に混合物として入れられていてもよい。本発明のキットは、さらに、各プローブ又は試料を溶解又は希釈するための緩衝液を含んでいてもよい。

本発明の方法及びキットは、核酸増幅反応液中の増幅産物のリアルタイムな定量に好適に用いることができる。本発明のキットは、このような標的核酸を核酸増幅法により増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいてもよい。このプライマーは、各プローブとは別個の容器に入れられる。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

プローブ 1 (配列番号 1)、プローブ 2 (配列番号 2)、及び標的オリゴヌク

レオチド（配列番号 3）を合成した。各オリゴヌクレオチドの合成は、株式会社日本バイオサービスに依頼した。プローブ 2 の塩基番号 2 1 のヌクレオチド（T）はFITCで、塩基番号 5 2 のヌクレオチド（T）はテキサスレッドで各々標識されている。尚、標的オリゴヌクレオチドは、ヒトアミリン遺伝子の部分配列である。

プローブ 1 の塩基番号 1 ～ 2 8 は、標的オリゴヌクレオチドの塩基番号 6 ～ 3 3 に相補的である。また、プローブ 1 の塩基番号 1 1 ～ 3 3、及び塩基番号 3 5 ～ 5 5 は、プローブ 2 の塩基番号 5 2 ～ 7 4 及び塩基番号 1 ～ 2 1 に、それぞれ相補的である。尚、配列番号 2 の塩基番号 5 7 ～ 7 4 は、配列番号 3 の 6 ～ 2 3 と相同である。

各オリゴヌクレオチドは、TE緩衝液に5  $\mu$ Mとなるように溶解した。1.5mlチューブに、10  $\times$  Ex Taq buffer（宝酒造（株） Lot. A6501-1）2.2  $\mu$ l、滅菌蒸留水 19.8  $\mu$ l、プローブ 2 溶液（5  $\mu$ M）1  $\mu$ lを加え、よく混合し、反応機（Cepheid社 Smart Cycler）用の25  $\mu$ l容チューブに23  $\mu$ lづつ分注した。各チューブに、プローブ 1 溶液（5  $\mu$ M）又はTE緩衝液 1  $\mu$ lを加え、さらに、標的オリゴヌクレオチド溶液（5  $\mu$ M）又はTE緩衝液 1  $\mu$ lを加え、反応液を得た。この操作は、室温で行った。

上記反応液、又は上記反応液を94℃で3分加熱処理したものをSmart Cyclerにセットし、47℃に調整し、波長505～537nmの蛍光を測定した。加熱処理しない反応液の結果を図 1 に、加熱処理したものの結果を図 2 に示す。

プローブ 2 のみでは蛍光が認められたが、プローブ 1 を加えた場合は、著しく消光された。プローブ 2 に、プローブ 1 とともに標的オリゴヌクレオチドを加えた場合は、その中間の強度の蛍光が観察された。この結果は、加熱処理の有無に関わらず、同様であった。

以上のように、標的配列が存在しない場合に比べて、標的配列が存在すると高い強度の蛍光が観察されたことから、プローブ 1 はプローブ 2 よりも標的配列に優先的に結合し、プローブ 2 の一部は遊離していることが確かめられた。

本発明により、標的核酸をリアルタイムに、かつ、簡便に定量することができる。本発明の方法は、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持つポリメラーゼを必要としないので、種々の反応系に適用することができる。

## 請求の範囲

1. 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法であって、下記ステップを含む方法：

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の領域とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープと、試料とを、第1のプロープと第2のプロープ、及び第1のプロープと標的核酸とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 前記標識物質の信号を検出する。

2. 第2のプロープの第2の領域は、第1のプロープの特異的領域よりも短いことを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 前記標識物質が、各々ループ領域を挟んで配置された蛍光物質と、この蛍光物質の近傍にあると蛍光物質の蛍光を消光するクエンチャーであり、第1のプロープと第2のプロープがアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、第1のプロープが第2のプロープとアニールしていないときは前記蛍光はアニールしているときと比べて消光されないことを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記信号の検出を定量的に行い、それによって標的核酸を定量することを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

5. 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出するためのキットであって、前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域

域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプローブとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプローブとを含むキット。

1 / 2

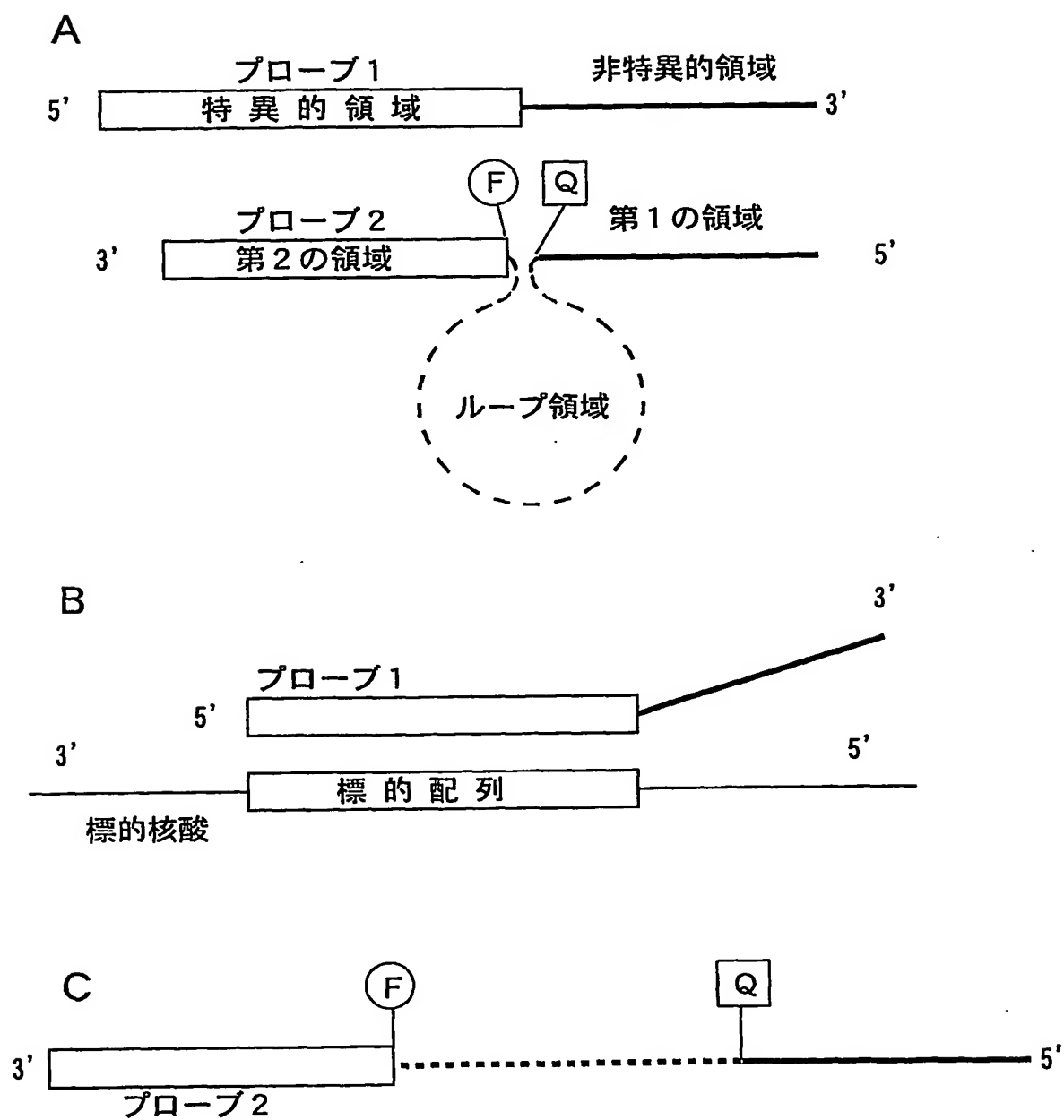


FIG. 1

2 / 2

FIG. 2

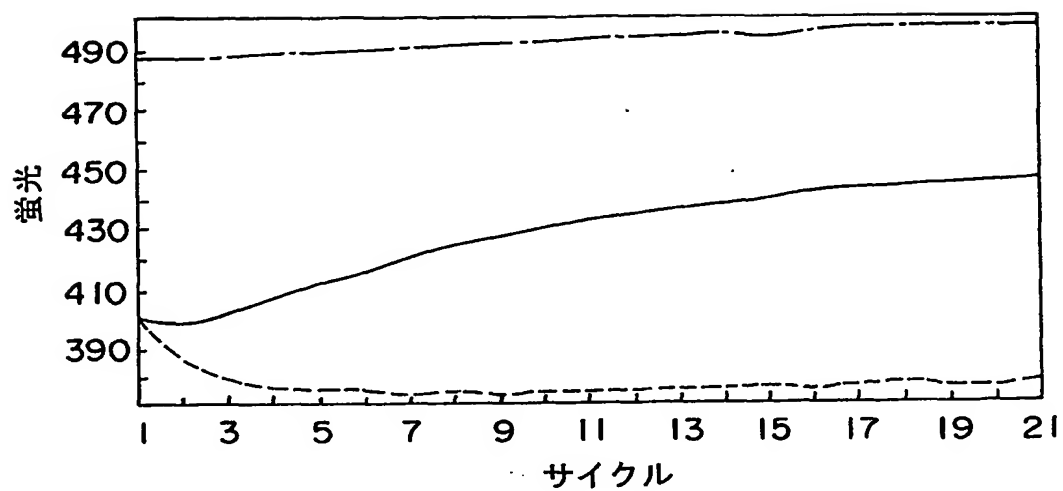
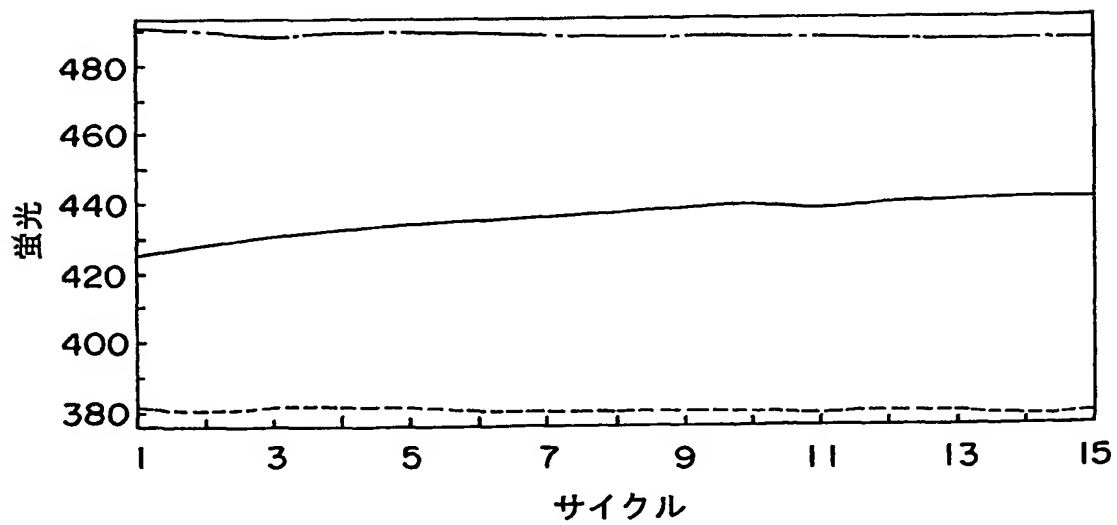


FIG. 3



## SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.

<120> A method for detecting a target nucleic acid

<130> G789-OP1545

<140>

<141> 2002-05-08

<150> JP 2002-132995

<151> 2002-05-08

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe 1

<400> 1

aaagttgttg ctggaatgaa ctaaaaaatg gcaatattca catgtacagg actcag 56

<210> 2

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe 2

<400> 2



ctgagtcag tacaactgaa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa attgccattt 60  
tttagttcat tccag 75

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: target oligonucleotide

<400> 3

ggcaaatttt ttagttcatt ccagcaacaa ctttggtgcc attctctcat 50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05773

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, 33/533, 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, 33/533, 33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

to claim No.

A	JP 5-123195 A (Hitachi, Ltd.), 21 May, 1993 (21.05.93), Full text (Family: none)	1-5
A	WO 92/02638 A1 (CETUS CORP.), 20 February, 1992 (20.02.92), Full text & US 5210015 A & US 5804375 A & EP 543942 A1 & EP 919565 A2 & EP 1302549 A2 & JP 6-500021 A	1-5
A	EP 487218 A1 (TOSOH CORP.), 27 May, 1992 (27.05.92), Full text & JP 5-237000 A	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 July, 2003 (03.07.03)Date of mailing of the international search report  
22 July, 2003 (22.07.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05773

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 881302 A2 (BECTON, DICKINSON AND CO.), 02 December, 1998 (02.12.98), Full text & US 5928869 A & US 5958700 A & JP 11-56380 A	1-5
A	EP 878554 A2 (BECTON, DICKINSON AND CO.), Full text 18 November, 1998 (18.11.98), & US 5846726 A & US 6054279 A & JP 11-123083 A	1-5
A	WO 93/05178 A1 (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.), 18 March, 1993 (18.03.93), Full text & US 5273881 A & US5670316 A & EP 612352 A1 & JP 6-510201 A	1-5
P,A	JP 2002-272473 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 24 September, 2002 (24.09.02), Full text (Family: none)	1-5
P,A	EP 1176215 A2 (BECTON, DICKINSON AND CO.), 30 January, 2002 (30.01.02), Full text & US 6277582 B1 & JP 2002-320488 A	1-5
P,A	WO 03/000933 A1 (GEORGIA TECH RESEACH CO.), 03 January, 2003 (03.01.03), Full text (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, 33/533, 33/566

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, 33/533, 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPI (DIALOG)  
JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 5-123195 A(株式会社日立製作所)1993. 05. 21 全文(ファミリーなし)	1-5
A	WO 92/02638 A1(CETUS CORPORATION)1992. 02. 20 全文 & US 5210015 A & US 5804375 A & EP 543942 A1 & EP 919565 A2 & EP 1302549 A2 & JP 6-500021 A	1-5
A	EP 487218 A1(TOSOH CORPORATION)1992. 05. 27 全文 & JP 5-237000 A	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03. 07. 03

国際調査報告の発送日 22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
本間 夏子



4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 881302 A2 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 1998. 12. 02 全文 & US 5928869 A & US 5958700 A & JP 11-56380 A	1-5
A	EP 878554 A2 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 1998. 11. 18 全文 & US 5846726 A & US 6054279 A & JP 11-123083 A	1-5
A	WO 93/05178 A1 (DAIKIN INDUSTRIES, LTD. ) 1993. 03. 18 全文 & US 5273881 A & US 5670316 A & EP 612352 A1 & JP 6-510201 A	1-5
PA	JP 2002-272473 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 2002. 09. 24, 全文 (ファミリーなし)	1-5
PA	EP 1176215 A2 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 2002. 01. 30 全文 & US 6277582 B1 & JP 2002-320488 A	1-5
PA	WO 03/000933 A1 (GEORGIA TECH RESEACH CORPORATION) 2003. 01. 03 全文 (ファミリーなし)	1-5